三叶木通微卫星分子标记开发及评价

李同建[1]，董婧[1]，廖亮[1]，金洪光[1]，韩兴杰[1]，文锋[1]，徐玲玲[1*]
（1. 九江学院药学与生命科学学院，江西 九江 332000）

摘要：三叶木通是一种多年生木质藤本植物，其果实较大，加之较高的药用和营养价值，使其有望开发成一种重要作物。近年来无序的种植和开发对三叶木通野生资源构成巨大威胁，因此野生种质资源保护和评价变得尤为重要。三叶木通分子生物学研究起步较晚，可用的分子标记较少，严重阻碍了资源的评价工作，急需开发合适的分子标记对现有资源进行遗传结构和遗传多样性评价。该文采用磁珠富集法构建三叶木通微卫星富集文库，在150个阳性克隆中发现70个微卫星位点，富集效率为46.67%，其中含双碱基重复单元的序列占比79.37%，三碱基和四碱基重复含有量较少。共设计引物63对，其中筛选出16对高多态引物，对1个三叶木通自然居群48个个体进行遗传分析，结果显示位点的等位基因数为10-22，观察杂合度和期望杂合度分别为0.370-0.792和0.724-0.936，多态信息含量为0.725-0.919，表明以上引物均为高多态性引物。其中12个位点偏离哈迪-温伯格平衡，呈现纯合子过剩状态，可能与哑等位基因和其它因素有关。结果表明本文开发的16对引物能够用于三叶木通遗传多样性和遗传结构评价工作，为三叶木通种质资源评价和开发等后续研究打下了基础。

关键词：三叶木通，微卫星，磁珠富集法
中图分类号：Q75　文献标识码：A　　文章编号：
DOI：10.11931/guihaia.gxzw201708040

Isolation and characterization of microsatellite markers for *Akebia trifoliata*

LI Tong-Jian[1], DONG Jing[1], LIAO Liang[1], JIN Hong-Guang[1], HAN Xing-Jie[1], WEN Feng[1], XU Ling-Ling[1*]

---

[1]收稿日期：2017-08-30
基金项目：国家自然科学基金（31460073, 31560075, 31560104, 31760047）；江西省卫计委科技计划项目（No. 2014A085）；江西省自然科学基金项目（No.20161BAB204165）；九江学院科研项目（No.2014KJYB025）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31460073, 31560075, 31560104, 31760047); Supported by Science and Technology Plan Projects of Jiangxi Health and Family Planning Commission (No. 2014A085); Supported by Natural Science Foundation of Jiangxi Province (No. 20161BAB204165); Supported by the Research Projects of Jiujiang University (No.2014KJYB025)]。
作者简介：李同建(1982 -)，男，山东省沾化县，博士，讲师，主要从事植物资源学研究，E-mail：15879218223@163.com。
*通信作者：徐玲玲，硕士，教授，主要从事植物分子生物学研究，E-mail：LingL239@163.com。

（1. *College of pharmacy and life science, Jiujiang University*, Jiujiang 332000, Jiangxi, China）

Abstract: *Akebia trifoliata* is perennial, woody vine producing large edible fruits. The high medicinal and nutritional values of *Akebia* make it worthy of being exploited as a new crop. Wild resources of these species were seriously deteriorated due to years of disorder planting and over-harvesting, thus wild germplasm resources protection and evaluation is particularly important. Since molecular biology research of *A. trifoliata* started late, short of available molecular markers seriously hindered the resource evaluation, and suitable molecular markers were urgently needed to develop for evaluation on genetic structure and genetic diversity of the existing resources. Enriched SSR library has been constructed using the magnetic beads enrichment procedure. Seventy SSR loci were obtained in 150 positive clones, and enrichment efficiency was 46.67%. Thereinto, sequences with two-base repeat unit accounted for 79.37%, far more than sequences with three-base and four-base. Sixteen pairs high polymorphic primers were chosen in 63 pairs primers and characterized by 48 individuals collected in Lushan. The allele numbers per locus ranged from 10 to 22, and the observed and expected heterozygosity ranged from 0.370 to 0.792 and from 0.724 to 0.936 respectively, polymorphisms information content ranged from 0.725 to 0.919, which showed that the above primers were high polymorphic primers. Twelve pairs of primers deviated from Hardy-Weinberg equilibrium, and showing excess of homozygotes, which might be related to null genes and other reasons. These molecular markers will contribute to evaluation on genetic diversity and population structure, lay a foundation for conservation and evaluation of *A. trifoliata* genetic resource.

Key words: *Akebia trifoliata*, microsatellite marker, magnetic bead enrichment

三叶木通(*Akebia trifoliata*)是木通科(Lardizabalaceae)木通属(*Akebia* Decne)的一种半落叶木质藤本缠绕植物，分布于秦岭以南至南岭，西至云南，东至浙闽

16 个省广大亚热带地区(万明长等, 2008)。其种下划分为三叶木通(*A. trifoliata* subsp. *trifoliata*)、白木通(*A. trifoliata* subsp. *australis*)、长萼三叶木通(*A. trifoliata* subsp. *longisepala*) 3 亚种(中国植物志编辑委员会, 2001)。木通属植物有利尿、镇痛、祛风湿的功效，作为中药有 2000 多年的历史(冯航, 2010; 李丽等, 2010; 李丽, 2010)。近期研究表明，其还具有抗衰老、提高免疫功能、抑制肿瘤等功效(An et al, 2016)。木通属植物果实较大，果肉甜糯，具有极高开发价值，在湖南、江西、贵州等地已有农户开始种植(罗克明等, 2008)。其种子含油量达 40%，而且具有较高的食用价值(仲伟敏和马玉华, 2016)。与其高开发价值不匹配的是三叶木通种质资源研究较晚，大规模无序的种植、开发对野生种质资源造成巨大威胁，因此有必要深入研究三叶木通种质资源，利用现代育种技术培育栽培品种，为三叶木通资源的可持续利用和种植产业起步打下基础。九江学院已搜集我国、日本和韩国 70 余个不同产地的野生三叶木通资源，建设了三叶木通种质资源圃。而由于三叶木通分子生物学研究起步较晚，GenBank 中仅能检索到 440 余条 DNA 序列，可用的分子标记较少，严重阻碍了资源的评价工作，因此急需开发合适的分子标记对现有资源进行遗传结构和遗传多样性评价 (Li et al, 2009; Sun et al, 2016; 黄佩蓓等, 2016)。

微卫星分子标记具有多态性高、共显性、重复性好、条带少易识别等诸多优点是目前遗传多样性和遗传结构研究中的首选标记之一(Grover & Sharma, 2016)，随着荧光毛细管电泳技术在微卫星检测中的应用，微卫星标记变得更加高效和廉价(Wenz et al, 1998)。本研究拟采用 三叶木通微卫星分子标记，并利用 7 个不同产地的三叶木通个体和 1 个三叶木通自然居群检测引物的稳定性和多态性，以期获得适于三叶木通遗传多样性和遗传结构研究的微卫星分子标记。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

本研究在人工种植基地采集栽培三叶木通 7 个，用于检测微卫星引物扩增稳定性和多态性。在九江庐山采集三叶木通自然居群 1 个（n=42），用于微卫星文库建立和后期引物评价（见表 1）。采集每个个体新鲜、健康的幼嫩叶片放入装有变色硅胶的自封袋中迅速干燥，置于-20℃低温冰箱中保存备用。凭证标本保

存于九江学院药学与生命科学学院分子生物研究室。

表 1 本研究所用样本信息

Table 1 Information of *Akebia trifoliata* samples used in this study

样本编号 Sample No.	采集地 Location	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔(m) Elevation	标本号 Voucher No.
1	怀化中方县 Zhongfang County, Huaihua	27°33.298′	110°24.854′	772	JJU201401
2	怀化桃江县 Taojiang County, Huaihua	28°31.496′	112°13.116′	53	JJU201402
3	湘西凤凰县 Fenghuang County, Xiangxi	27°58.886′	109°24.475′	670	JJU201403
4	张家界慈利县 Cili County, Zhangjiajie	29°25.076'	111°12.522'	238	JJU201404
5	宣城泾县 Jing County, Xuancheng	30°37.309'	118°26.957'	143	JJU201405
6	黄山 Huangshan	30°08.199'	118°14.634'	292	JJU201406
7	婺源 Wuyuan County, Jingdezhen	29°19.077'	117°50.294'	89	JJU201407
8-55	庐山 Lushan	29°18.009′	114°32.273′	186	JJU201408 – JJU201455

1.1.2 试剂

10×PCR buffer、25 mmol • L^{-1} $MgCl_2$、dNTPs 、DNA Taq 聚合酶（5 U • μL^{-1}）均购自上海生工生物（Sangon biology）工程有限公司；限制性内切酶 *Rsa* I（10 U • μL^{-1}）、*Bst*U I（10 U • μL^{-1}）、*Xmn* I（20 U • μL^{-1}）购自 New England Biolabs 公司；T4 DNA Ligase（400U • μL^{-1}）购自 Promega 公司；DNA Marker 购自大连 Takara 公司；接头引物 SuperSNX24-F (5’-GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGCAGAATC) 和 Super-SNX24-R (5’-GATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAAAA)由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

已干燥的三叶木通样本采用改良的 CTAB 法提取总 DNA(Doyle & Doyle, 1987)，并利用 PEG8000 纯化，详细步骤为：将 40% PEG8000 与 5 mol • L^{-1} NaCl 按 1:1 比例配置成工作液，与等比例的 DNA 溶液混合，摇匀并置于 37℃下静置 15 min，12000 rpm 离心 16 min，沉淀再由 80%乙醇清洗 2 次，烘干。TE 溶

解后用 Nanodrop 检测合格后，置于-20℃冰箱备用。

1.2.2 酶切与接头连接

使用限制性内切酶 *Rsa* I 或 *Bst*U I 和 *Xmn* I 组合对三叶木通基因组 DNA 进行酶切，于 37℃温浴过夜。酶切体系为 25 μL：2.5 μL 10×T4 ligase buffer（NEB4），0.25 μL 100×BSA，0.25 μL 5 mol • L^{-1} NaCl，1.0 μL 10 U • $μL^{-1}$ *Rsa* I/*Bst*U I，1.0 μL 20 U • $μL^{-1}$ *Xmn* I，20 μL 200 ng • $μL^{-1}$ DNA。取 1μL 酶切产物用 1%琼脂糖胶电泳检测酶切片段是否位于 200~800 bp 范围内，然后将 SuperSNX24-F 和 SuperSNX24-R 合成接头置于水浴锅中 95℃反应 5 min，缓慢冷却至室温。制备好的接头与酶切产物连接，反应体系如下：7 μL 接头，2.5 μL NEB 10×T4 ligase buffer，2.0 μL 350 U • $μL^{-1}$ T4 ligase，13 μL 酶切产物，加双蒸水至 25 μL，16℃连接过夜。将连接产物作为模板，利用 SuperSNX24-F 接头作为引物通过 PCR 扩增检测连接结果。反应体系如下：2.5 μL 10×PCR buffer，0.13 μL 100 μmol • L^{-1} SuperSNX24-F，1.5 μL 2 mmol • L^{-1} dNTP，2.0 μL 25 mmol • L^{-1} $MgCl_2$，2.5 μL BSA，0.2 μL 连接产物 DNA，加双蒸水至 25 μL。PCR 反应程序：95℃预变性 2 min；95℃变性 20 s，60℃退火 20 s，72℃延伸 1.5 min，循环 24 次；72℃延伸 10 min。

1.2.3 杂交与磁珠富集

微卫星富集采用 Glenn 和 Schable（2005）的方法，将连接产物与带生物素的探针混合物$(AG)_{12}$、$(CG)_{12}$、$(AT)_{12}$、$(GT)_{12}$、$(ACT)_{12}$、$(AAGT)_8$、$(AACT)_8$、$(AGAT)_8$进行杂交。杂交反应体系：25 μL 2×Hyb solution，10 μL 10 μmol • L^{-1} 生物素标记的探针，10 μL 连接产物，加双蒸水至 50 μL。杂交反应程序：95℃预变性 5 min；70℃开始，每个循环降低 0.2℃，维持 5 s，循环 99 次；50 ℃保持 5 min；然后每个循环降低 0.5℃，保持 5 s，循环 20 次；15℃保持。用链霉素亲和磁珠（Promega MagneSphere）捕获结合了生物素探针的 DNA 片段，用洗脱液洗脱未结合的探针。具体操作如下：250 μL TE 洗涤 50 μL 混匀的磁珠 2 次，50 μL 1×Hyb solution 平衡磁珠 2 次；将 DNA 和生物素探针混合物的杂交体系加入到磁珠中，于 16℃下 150 rpm 振荡约 1 h 杂交；加入 400 μL Wash Solution I 洗脱 2 次，加入 400 μL Wash Solution II 于 45℃-48℃水浴振荡 2 min 洗脱 2 次，再次加入 400μL Wash Solution II 混匀，于 50℃-53℃水浴振荡 2 min 洗脱 2 次。加入 200μL TE 于 95℃水浴 5 min 彻底洗脱富集 DNA，向上清液中加入 22 μL3

mol • L^{-1} 醋酸钠和 445 μL 预冷的无水乙醇，沉淀 DNA。然后用 80%乙醇洗涤，离心烘干后加入 20 μL TE 溶解。用接头 SuperSNX24-F 作为引物对富集产物进行 PCR 扩增回收，PCR 反应体系和程序与检测时相同。为增加富集的阳性率，重复以上步骤一次，进行二次富集，然后用 PEG8000 法纯化 DNA。

1.2.4 克隆与阳性筛选

将纯化后的富集产物克隆到 pEGM-T 载体中，连接反应在 PCR 仪上 16℃过夜，将重组子转入大肠杆菌感受态细胞中培养 24 h。每板挑取 50-100 个白色单菌落，在另一含 Amp 的 LB 固体培养基平板上划线，并接种于菌落 PCR 反应液中，通过菌落 PCR（M13F 和 M13R 为引物）筛选出阳性克隆，把划线的平板置于 37℃培养箱中培养过夜。然后取 3 μL 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测其是否为含有目的片段的阳性菌落。选择 PCR 检测为阳性的菌落接种至 500 μL 含 Amp 的 LB 液体培养基中，于 37℃下 200 r/min 振荡培养过夜，将培养菌液送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 序列分析与引物设计

将测序结果导入 Geneious 4.8 软件中进行检测，使用 Trim-ends 和 Search for the motifs 工具去除载体和接头序列，对有叠峰的序列进行反向测序。然后将经过处理的序列通过 Tandem Repeats Finder version 4 确定 SSR 位点，并分析位点的碱基重复序列和重复次数、查看序列长度及微卫星位点两端侧翼序列是否符合引物设计的要求(Benson, 1999)。使用 Geneious 4.8 内嵌的引物设计功能进行引物设计。所设计引物送于上海生工生物工程有限责任公司合成。

1.2.6 引物稳定性、多态性筛选及评价

为了筛选扩增稳定性好、多态性高的引物和其最佳 PCR 条件，我们用设计的引物对 7 个不同地区采集的三叶木通进行 PCR 扩增，PCR 产物经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

将筛选出的高多态性 SSR 引物合成 5’端荧光标记引物，其荧光基团为 FAM（蓝色），HEX（绿色）。选取采集于九江庐山的 48 个样本进行 PCR 扩增送往北京阅微基因有限公司使用 ABI3730 遗传分析仪进行 STR 分型，内标均为 ROX500。

1.2.7 数据分析

使用 Genemapper 4.1 软件进行数据统计，通过 Micro-checker 2.2.3 检测哑等位基因(Van Oosterhout et al, 2004)，然后用 Genalex 6.5 (Peakall & Smouse, 2006)计算出每个位点的等位基因数（Na）、有效等位基因数（Effective Number of Alleles，Ne）、观察杂合度（Observed Heterozygosity，Ho）、期望杂合度（Expected Heterozygosity，He）及哈迪温伯格平衡（Hardy-Weinberg equilibrium，HWE），使用 PowerMaker (Liu & Muse, 2005)计算多态性信息指数（Polymorphic Information Content，PIC）和连锁遗传不平衡(linkage disequilibrium，LD)，所有 *P* 值均经 Bonferroni 法校正。

2. 结果与分析

2.1 微卫星富集

本研究选择 2 个限制性内切酶组合（*Rsa* I 和 *Xmn* I、*Bst*U I 和 *Xmn* I）对三叶木通基因组进行酶切，*Rsa* I 和 *Xmn* I 的组合酶切后基因组小片段电泳条带弥散，大小分布在 100-1500 bp 之间，为后续实验的连接和杂交富集打好基础；而 *Bstu* I 和 *Xmn* I 的组合酶切片段较长，片段长度集中在 100-200 bp、300-500 bp 及大于 1500 bp 不等，这些酶切产物不利于后续磁珠富集操作。本实验用金属浴加热进行漂洗，首先在 16℃下用 Washing solution I 漂洗一次，再用 Washing solution II 分别在 45℃和 50℃下漂洗两次，结果富集率太低。然后调整漂洗温度，用 Washing solution II 分别在 46℃和 51℃下漂洗两次，获得所需目的片段，且大大提高了阳性克隆率。

共挑取 230 个阳性克隆进行 PCR 检测，大小在 300-1000 bp 之间，其中约有 40 个未扩增出目的片段，部分菌落空载。在 190 个阳性克隆中挑选出片段长度不同的 150 个单菌落送往公司测序，148 个测序成功，其中 70 个含有微卫星序列，富集率为 46.67%。其中可设计引物的序列有 57 条，占 SSR 序列的 81.43%。57 条可设计引物的序列共设计引物 63 对，其中含双碱基重复单元的序列占 SSR 序列的 79.37%，高于三碱基重复单元的序列占 SSR 序列的 20.63%。

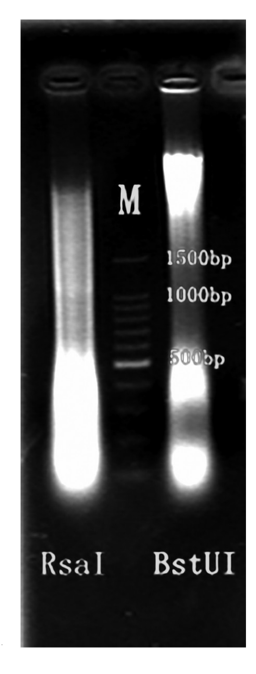


图 1 *Rsa* I/*Xmn* I 及 *Bst*U I/*Xmn* I 酶切结果

Fig.1 The restriction enzymes digestion of *Rsa* I / *Xmn* I and *BstU* I /*Xmn* I

2.2 引物筛选与分析

54 对引物扩增产物大小在 100-300 bp 之间。先用 7 个 DNA 样本为模板初次筛选出条带清晰、有多态性的引物 33 对。然后，用 48 个 DNA 样本为模板进一步对 33 对引物进行筛选，选出条带清晰、非特异性条带少、多态性较高及扩增效率稳定的引物 16 对，可以用于 SSR 位点分析。

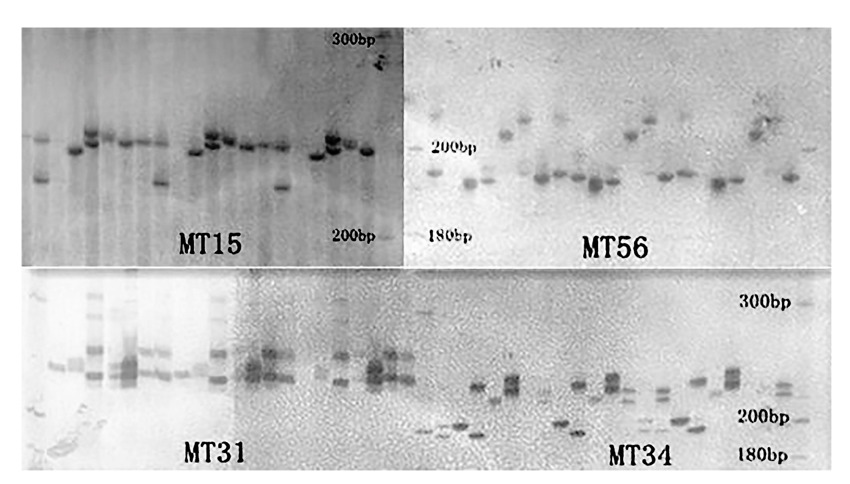


图 2 7 个样本部分引物筛选电泳图

Fig. 2 The electrophoresis detection picture of 7 samples

48 个样品的三叶木通居群中共检测到 220 个等位基因，每个位点的等位基因数为 10-22 个，平均等位基因数为 15.938。观察杂合度为 0.370-0.792；期望杂

合度为 0.724-0.936。多态信息含量为 0.725-0.919（均值为 0.861），其中 12 个位点经 Bonferroni 校正后仍然偏离哈迪-温伯格平衡，呈现纯合子过剩状态，检测到 14 个位点存在大小不等的哑等位基因频率。发现 3 个引物对（MT33-MT45，MT15-MT56 和 MT35-MT62）存在连锁不平衡。

表 1 16 对微卫星引物的基因序列和三叶木通居群的遗传多样性评估情况

Table 1 Primer sequences and genetic diversity estimates of sixteen microsatellites markers in *Akebia trifoliata*

位点名称 Lucos Name	引物序列 Primer sequences (5'–3')	等位基因范围 Allele size range (bp)	重复单元 Repeat motif	退火温度 T_a (°C)	哑等位基因频率 Null allele frequencies	N_a	H_e	H_o	PIC
MT15	F: TCAACACCGTCAATGGGAGGA R: AAGCAACAAAAAGAGTTGCTCATGAAT	209-242	(CA)12	53	0.212	13	0.830	0.479	0.842
MT19*	F: AAAGCAGCTGAGGCCGATCA R: TCAGGGAAACCCCTTGTTTTCA	174-204	(TC)34(CA)28	53	0.253	16	0.906	0.444	0.904
MT27*	F: TCCAACCGTAGGAAAAGAAAAA R: ACCACAAGGCAGAGATTTTG	176-194	(CCA)5	50	0.269	10	0.834	0.370	0.858
MT28*	F: ACAACACTCTCTGAACCTTTAGC R: TCCAACCAACAAACACAAAACGA	176-210	(GA)7-(TC)19	55	0.137	17	0.920	0.667	0.905
MT29	F: TCTTCCCCTCAACTGTATGGA R: ACTTGTTGCCCAGACTCCCA	213-240	(TC)10(CA)8	53	-	10	0.724	0.708	0.725
MT31*	F: TCTGGGATTACTTGAGCAGGCA R: CGCTGACGTGGTAGCGCACA	230-260	(TG)9(GA)8	51	0.162	14	0.855	0.583	0.836
MT33	F: ACAGAAGACTTGGTTTTGGGTGT R: ATGAGTCGAAGCCCCGCCCT	164-202	(TTG)4	53	-	13	0.757	0.688	0.732
MT34	F: TGAAGAGTGTCAATGCTTCCCCT R: ACCCACAACTGAGGTTCTCCA	194-238	(TC)20	56	0.100	20	0.936	0.750	0.919
MT35*	F: TCAGTGAGTTACTTTTGCCTGT R: AGTGCTGAGGAACTTGCACATGA	129-163	(AG)16	51	0.062	18	0.909	0.792	0.895
MT38*	F: TCCTTCAAAAAGTGACAGGAGGA R: ACTGTCAATCAACCTTGTCGCC	159-234	(GT)16	53	0.232	16	0.851	0.458	0.868

MT39*	F: TGACATGTTGATGTGCACGGAT R: TGCCAGTAGTACAACATGTAAG	195-223	(TG)14	55	0.163	13	0.887	0.596	0.879
MT40*	F: GTGCGATCCAGACGCACCTC R: ACCTGAATGGGCATCCATTTGT	138-174	(TC)15	52	0.139	19	0.894	0.646	0.883
MT45*	F: ACGAAAGTTGCACTCCTTCCCT R: TGCGCTGATGTGGTGTGGTCG	124-209	(AG)16(TG)18	52	0.264	22	0.916	0.426	0.884
MT48*	F: TTTGCAGCGCCACACGACCT R: ACCCATTGCAGCCTTCTGTC	172-210	(AG)21	53	0.156	16	0.921	0.630	0.895
MT56*	F: AGAAAGGGAGTGTAGGAAATGC R: GCAACCGACCTTGAACTCCGACG	180-224	(AG)13	53	0.119	22	0.922	0.702	0.898
MT62*	F: TCCAGCCAACTCCAACCATGTCA R: ACATCTCTTTCCCACACTCCCA	107-202	(TC)17(CA)5	55	0.085	16	0.900	0.750	0.859
平均值 Mean						15.938	0.873	0.606	0.861

注：T_a：退火温度；N_a：等位基因数；H_o：观察杂合度；H_e：期望杂合度；*：显著偏离哈迪-温伯格平衡（$P< 0.05$）。

Note: T_a: annealing temperature; N_a: observed No. of alleles; H_o: observed heterozygosity; H_e: expected Heterozygosity; *: Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium at $P< 0.05$.

3. 结论与讨论

随着高通量测序技术的发展，使得SSR位点的获得更加低廉、高效，越来越多的研究利用简化基因组测序和转录组测序技术进行高效的微卫星开发（万冬梅等，2016）。在群体遗传和进化研究中需要的微卫星位点数量较少，磁珠富集法可在1周内完成微卫星富集文库构建工作，其高效、快捷的特点更适合少量微卫星引物的开发(王静等, 2015)。在本研究中，因实验室熟练掌握了磁珠富集法，故选用该方法构建三叶木通的微卫星富集文库，在148个成功测序的阳性克隆中获得70个富含微卫星的序列，富集效率较高，达到46.67%。虽然本研究使用了8种不同的探针，包括双碱基重复、三碱基重复和四碱基重复，但富集的微卫星序列主要以双碱基重复为主（79.37%），三碱基和四碱基重复含有量较少。开发的16对引物中也仅有2对引物为三碱基重复（MT27，MT33）。这与前人报道的植物中微卫星序列主要以双碱基重复为主一致(Morgante & Olivieri, 1993)。

利用筛选到的16对引物对采自庐山的三叶木通居群进行遗传分析，共扩增出220个多态性条带，发现以上引物的平均等位基因数为15.938个，观察杂合度为0.370-0.792；期望杂合度为0.724-0.936，这与李丽的研究结果相近(李丽, 2010)。多态信息含量（PIC）是评估微卫星引物多态性水平的重要参数，普遍认为PIC>0.5为高多态引物，0.5>PIC>0.25中多态引物，PIC<0.25为低多态引物(Botstein et al, 1980)。本研究开发的16对引物多态信息含量范围为0.725-0.919，平均值为0.861，表明以上引物具有较高的多态性，可以有效的用于三叶木通遗传多样性分析。哈迪-温伯格平衡检验表明有12个位点显著偏离了HWE，经MICRO-CHECKER检验发现，以上位点均有哑等位基因存在（0.062-0.269），表明哑等位基因可能是导致位点偏离HWE的原因之一，其他因素，如：采样、近郊、营养繁殖等也有可能是导致偏离HWE的原因(Li, Yao, Chen & Huang, 2009)。

综上分析，本研究开发的16对SSR多态性引物可用于三叶木通遗传分析，进一步补充和完善了木通微卫星分子标记工具，为三叶木通种质资源评价和开发等后续研究打下了坚实基础。

参考文献：

AN JP, HA TKQ, KIM JW, et al, 2016. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from the stems of *Akebia quinata*[J]. Molecules, 21(8):1091.

GROVER A, SHARMA PC, 2016. Development and use of molecular markers: past and present[J]. Crit Rev Biotechnol, 36(2):290-302.

BENSON G, 1999. Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences.[J]. Nucleic Acids Res, 27(2):573.

BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, et al, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.[J]. Am J Hum Genet, 32(3):314.

DOYLE JJ, DOYLE JL, 1987. A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 19(1):11-15.

FENG H, 2010. On current research of chemical compositions and pharmacological action of *Akebia trifoliate*[J]. J Xi' an Univ Arts Sci Nat Sci, 13(04):16-18. [冯航, 2010. 三叶木通化学成分和药理作用研究进展[J]. 西安文理学院学报(自然科学版), 13(04):16-18.]

FLORA OF CHINA EDITORIAL COMMITTEE, 2001, Flora of China valume 29[M]. Beijing: Science Press:004. [中国植物志编辑委员会, 2001. 中国植物志第29卷[M]. 北京: 科学出版社: 004.]

GLENN TC, SCHABLE NA, 2005. Isolating microsatellite DNA loci[J]. Method Enzymol, 395:202-222.

HUANG PQ, CHEN SH, WANG F, et al, 2016. SRAP Analysis on *Akebia* Decne. Germplasm Resources[J]. Hubei Agric Sci, 55(07):1747-1750. [黄佩蓓, 陈世华, 王飞, 等, 2016. 木通属植物种质资源的SRAP分析[J]. 湖北农业科学, 55(07):1747-1750.]

LI L, YAO X, CHEN X, et al, 2009. Development and characterization of microsatellite loci in Chinese medicinal plant *Akebia trifoliate* ssp. *australis* and cross-species amplification in closely related taxa[J]. Conserv Genet, 10(4):959-962.

LI L, CHEN XZ, YAO XH, et al, 2010. Geographic Distribution and resource status of three important *Akebia* Species[J]. J Wuhan Bot Res，28(04):497-506. [李丽, 陈绪中, 姚小洪, 等, 2010. 三种木通属植物的地理分布与资源调查[J]. 武汉植物学研究, 28(04):497-506.]

LI L. 2010. Population Genetics of Three Medicinal Akebia Species[D]. Wuhan: Graduate University of Chinese Academy of Science:48-51. [李丽. 2010. 三种药用木通属植物的居群遗传学研究[D]. 武汉: 中国科学院研究生院: 48-51.

LIU K, MUSE SV, 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 21(9):2128-2129.

LUO KM, LIU XW, YANG YY, et al, 2008. The growth and fruiting habit of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz under the cultivation condition[J]. Guizhou Agric Sci，36(03):123-124. [罗克明, 刘学武, 杨永英, 等, 2008. 三叶木通栽培条件下的生长结果习性[J]. 贵州农业科学, 36(03):123-124.]

MORGANTE M, OLIVIERI AM, 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. Plant J, 3(1):175-182.

PEAKALL R, SMOUSE PE, 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Mol Ecol Resour, 6(1):288-295.

SUN Z, YE L, ZHANG F, et al, 2016. Development of microsatellite markers for *Sargentodoxa*

cuneata (Lardizabalaceae) using next-generation sequencing technology[J]. Appl Plant Sci, 4(5):1600003.

VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINSON WF, WILLS DP, et al, 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data[J]. Mol Ecol Resour, 4(3):535-538.

WAN DM, HAN M, LI CA, et al, 2016. Development of Microsatellite in Marsh Tit *Parus Palustris* Using Illumina MiSeq[J]. J Liaoning Univ Nat Sci, 43(3):252-257.[万冬梅, 韩梅, 李成安, 何雨昕,等，2016. 基于高通量测序的沼泽山雀简化基因组微卫星位点的开发[J]. 辽宁大学学报(自然科学版, 43(3):252-257.]

WAN MC, LIU XW, BAN XZ, et al, 2008. The Fruit Character and nutrition composition of *Akebia trifoliata* (Thunb.)Koidz under the Cultivation Condition[J]. Guizhou Agric Sci, 36(03):121-122. [万明长, 刘学武, 班小重, 等, 2008. 三叶木通栽培条件下果实性状及营养成分分析[J]. 贵州农业科学, 36(03):121-122.]

WANG J, HU W, YANG Y, et al, 2015. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Eomecon chionantha*, a monotypic sepecies endemic to china[J]. Plant Sci J, 33(06):855-860. [王静, 胡菀, 阳亿, 等, 2015. 中国特有单种属血水草的微卫星分子标记开发与评价[J]. 植物科学学报, 33(06):855-860.]

WENZ H, ROBERTSON JM, MENCHEN S, et al, 1998. High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis[J]. Genome Res, 8(1):69-80.

ZHONG WM, MA YH, 2016. Analysis and evaluation of nutritional components in *Akebia trifoliate* seeds[J]. Southwest China J Agric Sci, 29(1):169-173. [仲伟敏, 马玉华, 2016. 三叶木通种子的营养成分分析与评价[J]. 西南农业学报, 29(1):169-173.]